

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

008988434

WPI Acc No: 1992-115702/199215

XRAM Acc No: C92-053867

**Stabilised thrombin compsns. for determinn. of plasma thrombin - contain thrombin, HEPES buffer, thiomersal and gelatin**

Patent Assignee: KALLIES IMPORT-EXPORT VERTRIEB GMBH (KALL-N); KALLIES IMPORT-EXPO (KALL-N)

Inventor: DORNHEIM G; FRIEDEL G; FUNKE U; LABUS D; LUTZE G; SCHMIDT L; SEIFERT A; TOEPFER G; TOPFER G

Number of Countries: 009 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 478827	A	19920408	EP 90118976	A	19901004	199215 B
EP 478827	B1	19940406	EP 90118976	A	19901004	199414
DE 59005286	G	19940511	DE 505286	A	19901004	199420
			EP 90118976	A	19901004	

Priority Applications (No Type Date): EP 90118976 A 19901004

Cited Patents: 1.Jnl.Ref; DD 150544; DE 3536903; EP 123304; EP 244771

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	--------	----------	--------------

EP 478827	A	11		
-----------	---	----	--	--

Designated States (Regional): BE CH DE ES FR GB IT LI NL

EP 478827	B1	G	14	C12N-009/74
-----------	----	---	----	-------------

Designated States (Regional): DE

DE 59005286	G		C12N-009/74	Based on patent EP 478827
-------------	---	--	-------------	---------------------------

Abstract (Basic): EP 478827 A

Stabilised thrombin compsns. contain thrombin, HEPES buffer, thiomersal, and gelatin produced by partial hydrolysis of collagen.

Pref. the compsns. are in the form of an isotonic saline soln. contg. (per litre): 2500 NIH units of thrombin, 26.4-52.8 (esp. 44) ml of 1.15 M HEPES (pH 7.55), 250-750 (esp. 500)mg thiomersal, 25-40 (esp. 33)ml of a gelatin soln. (35g/l gelatin and 8g/l NaCl), and opt. 0.11g 'Polybren' (copolymer of N,N,N',N'-tetramethyl-1,6- hexanediamine and 1,3-dibromopropane).

USE/ADVANTAGE - The compsn. are useful as reagents for determinn. of plasma thrombin times. The additives provide synergistically enhanced storage and freeze-thaw stability.

Dwg.0/0

Abstract (Equivalent): EP 478827 B

Stabilised thrombin, particularly for use as a clotting-time agent, on the basis of thrombin and a stabiliser characterised by a stabiliser mixture composed of a stabiliser I: HEPES-buffer; a stabilizer II: thiomersal; a stabiliser III: gelatine obtained by partial hydrolysis of collagen.

Dwg.0/0

Title Terms: STABILISED; THROMBIN; COMPOSITION; DETERMINE; PLASMA; THROMBIN ; CONTAIN; THROMBIN; BUFFER; GELATIN

Derwent Class: A96; B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-009/74

International Patent Class (Additional): C12N-009/96; C12Q-001/56

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): A03-C01; A12-V03C2; B04-B02C3; B04-B04A6; B04-B04D3 ; B05-A03A; B07-D11; B12-K04; D05-H09

Plasdoc Codes (KS): 0208 0231 1727 1892 1913 1986 2008 2318 2509 2572 3002 3194 3288

Polymer Fragment Codes (PF):

\*001\* 014 04- 045 062 153 157 206 208 225 231 244 256 316 334 398 50& 532  
536 57& 57- 58& 645 722 023 172 189 191 198 200 231 250 257 300 319  
328

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M430 M782 M903 P831 Q233 V600 V613 V751 R06051-M

Chemical Fragment Codes (M2):

\*02\* F011 F014 F553 H4 H401 H481 H8 K0 K4 K431 L7 L721 M280 M312 M322  
M332 M342 M383 M392 M413 M430 M510 M521 M530 M540 M782 M903 M904

P831 Q233

\*03\* A680 A910 A960 G011 G100 H4 H494 H9 J0 J011 J1 J131 M210 M212 M250  
M281 M320 M411 M430 M510 M520 M531 M540 M630 M650 M782 M903 M904  
M910 P831 Q233 R00086-M

Derwent Registry Numbers: 0086-U; 1740-U

Specific Compound Numbers: R06051-M; R00086-M

?





Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: 0 478 827 A1

(12) EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 90118976.1

(51) Int. Cl. 5: C12N 9/74, C12N 9/96,  
C12Q 1/56

(22) Anmeldetag: 04.10.90

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
08.04.92 Patentblatt 92/15

(64) Benannte Vertragsstaaten:  
BE CH DE ES FR GB IT LI NL

(71) Anmelder: KALLIES IMPORT-EXPORT  
VERTRIEB GMBH  
Götzingerstrasse 17  
O-8360 Sebnitz(DE)

(72) Erfinder: Töpfer, Gottfried  
Am Feierabendheim 26  
O-8900 Görlitz(DE)  
Erfinder: Friedel, Gisela  
J.-Fucik-Strasse 43  
O-8902 Görlitz(DE)  
Erfinder: Seifert, Andreas  
Th.-Körner-Strasse 5  
O-8900 Görlitz(DE)  
Erfinder: Funke, Udo

Rietsc heilstrasse 20  
O-8800 Zittau(DE)  
Erfinder: Labus, Dieter  
Ostring 64  
O-8909 Görlitz(DE)  
Erfinder: Lutze, Gerd  
Schreiberstrasse 6  
O-3090 Magdeburg(DE)  
Erfinder: Schmidt, Lothar  
Martin-Opitz-Strasse 1  
O-8900 Görlitz(DE)  
Erfinder: Dornheim, Günter  
Karl-Marx-Strasse 51  
O-6018 Suhl(DE)

(74) Vertreter: Patentanwälte Beetz sen. - Beetz  
jun. Timpe - Siegfried - Schmitt-Fumlan-  
Mayr  
Steinsdorfstrasse 10  
W-8000 München 22(DE)

(54) Stabilisiertes Thrombin, seine Herstellung und seine Verwendung als Thrombinzeitreagens.

(57) Die Erfindung betrifft stabilisiertes Thrombin, Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung als Reagens zur Bestimmung der Thrombinzeit.

Das erfindungsgemäß stabilisierte Thrombin enthält ein Stabilisatorgemisch aus

Stabilisator I : HEPES-Puffer,

Stabilisator II : Thiomersal,

Stabilisator III: durch partielle Hydrolyse von Collagen erhaltene Gelatine sowie gegebenenfalls

Stabilisator IV: Polybren.

Das Reagens ist ohne Stabilisator IV heparinempfindlich, mit Stabilisator IV bis zu 2 U Heparin/l heparinunempfindlich.

Das stabilisierte Thrombin liegt vorzugsweise in Form einer isotonischen Kochsalzlösung vor.

Das flüssige Reagens besitzt gute Lagerungsstabilität und kann ohne Aktivitätsverlust lyophilisiert werden. Die Lyophilisate sind in gefriergetrocknetem Zustand stabil.

Mit diesem Reagens können Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Thrombinzeitbestimmung erheblich verbessert werden. Ebenso wird die Anwenderfreundlichkeit der Methode (Bestimmung mit und ohne Beeinflussung durch Heparin) erhöht.

Das Reagens kann in einfacher Weise hergestellt und wiederholt ohne Aktivitätsverlust eingefroren und aufgetaut werden.

EP 0 478 827 A1

Die Erfindung betrifft ein stabilisiertes Thrombin als Reagens zur Bestimmung der Thrombinzeit, ein Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung.

Thrombin (Gerinnungsfaktor IIa) hat eine große Bedeutung für hämostaseologische Untersuchungen. Die Instabilität von Thrombin besonders in Lösung beeinträchtigt aber die Ergebnisse analytischer Methoden und damit deren Anwendbarkeit bei der Klärung diagnostischer und anderer Fragestellungen.

Es ist bekannt, daß die Instabilität von Thrombin bei der Thrombinzeitbestimmung (z.B. nach A.B.(D.L.)-DDR) einerseits besondere Festlegungen erfordert, welche die Herstellung, Einstellung und Haltbarkeit der Thrombin-RL betreffen, andererseits wird der Test durch das Fehlen eines stabilen und standardisierten Reagens arbeitsaufwendig, und die Verwertbarkeit der Ergebnisse für bestimmte diagnostische Fragestellungen ist eingeschränkt bzw. wird durch die mangelnde Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Methode beeinträchtigt.

So muß z.B. die Thrombin-RL-Serie für die Bestimmung der Thrombinzeit des Plasmas (z.B. nach A.B.- (D.L.)-DDR-83) für jede Untersuchungsreihe in ihrer Aktivität neu mit Normalplasma auf  $17,5 \pm 0,5$  s eingestellt werden.

Die Haltbarkeit von Thrombin in Polyethylengefäßen bei  $37^{\circ}\text{C}$  wird mit 1 h angegeben. Genauigkeit und Richtigkeit der Methode lassen daher zu wünschen übrig. Diese Methode ist ferner nicht zur Überwachung der Heparintherapie geeignet.

Aus DD-A-158857 ist ein Thrombinstabilisator für Laboratoriumsdiagnostika bekannt, der auf der synergistischen Wirkung von Proteaseinhibitoren (Aprotinin), einem Chelatbildner, vorzugsweise Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), und Rinderserumalbumin beruht. Als Substrat für das stabilisierte Thrombin wird dabei das chromogene Substrat Tos-Gly-Pro-Arg-pNa verwendet.

Dieser Stabilisator ist für die Thrombinzeitbestimmung (Substrat Fibrinogen) nicht verwendbar, da die Chelatbildner die Calciumionen des Plasmas weitgehend binden, wodurch es zu einer Polymerisationshemmung bei der Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung kommt. Infolgedessen werden 100-fach höhere Thrombin-Konzentrationen benötigt, um eine Gerinnung von Plasma zu erreichen. Der Test ist jedoch in dieser Form nicht mehr für die Thrombinzeitbestimmung hinsichtlich der diagnostischen Fragestellung geeignet, ob eine Antithrombinwirkung bzw. eine Polymerisationshemmung oder ein Fibrinogenmangel bzw. eine Dysfibrinogenämie vorliegen. Werden die Chelatbildnerkomponente und das Aprotinin weggelassen (M. Miller-Andersson et al.: Preparation and Stability of a Highly Purified Human Thrombin Standard, Thromb. Res. 20 (1980) 109-122), so ergibt sich bei hochgereinigtem Thrombin allein durch die Albuminkomponente schon ein thrombinstabilisierender Effekt; die erreichte Stabilität ist jedoch nicht ausreichend. Das Verfahren ist außerdem kostenaufwendig, bedingt durch den relativ hohen Preis des Albumins.

Gemäß DD-A-150544 wird GelaFusal®, eine Lösung partiell abgebaut, durch Hydrolyse von Collagen erhaltener Gelatine, zur Stabilisierung von Streptokinase eingesetzt. Allerdings ist in dieser Druckschrift nur eine Stabilitätserhöhung der Lyophilisate beschrieben, und die vorgeschlagenen GelaFusal-Konzentrationen sind für eine Stabilisierung des Thrombins nicht wirksam.

HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure) ist ferner als hervorragender zwitterionischer Puffer zur Stabilisierung von Plasma beschrieben (G. Töpfer et al.: Beitrag zur Kontrolle der Qualität von Gerinnungsanalysen, 1. Mitt.; Zbl. Pharm. 123 (1984) 697-701), jedoch ist ein thrombinstabilisierender Effekt bisher unbekannt.

Infolge der Abgabe von  $\text{CO}_2$  aus dem Plasma kommt es innerhalb von 2 bis 3 h nach der Blutentnahme (z.B. Citratblutgewinnung nach A.B.(D.L.)-DDR) zu einer pH-Wert-Erhöhung des Plasmas, die in Abhängigkeit des Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen unterschiedlich hoch ausfällt.

Diese Veränderung des pH-Werts kann das Ergebnis der Thrombinzeitbestimmung in einem solchen Umfang beeinflussen, daß vollkommen unbrauchbare Resultate erhalten werden (vgl. Tab. 3).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein als Thrombinzeitreagens geeignetes stabilisiertes Thrombin und seine Herstellung und Verwendung anzugeben, womit die bestehenden, auf der Instabilität des Thrombins beruhenden Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Thrombinzeit überwunden werden sollen.

Neben der Gewährleistung einer ausreichenden Lagerungsstabilität soll das Thrombinzeitreagens ohne Aktivitätsverlust lyophilisiert werden können und in der gefriergetrockneten Form stabil sein. Weiterhin sollen die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Thrombinzeitbestimmung verbessert und ihre Anwendungsfreundlichkeit erhöht werden.

Das stabilisierte Thrombin sollte ferner auch eine Thrombinzeitbestimmung ohne Beeinflussung durch Heparin gestatten.

Die Aufgabe wird anspruchsgemäß gelöst. Die abhängigen Ansprüche betreffen vorteilhafte Ausführungsformen.

Das erfindungsgemäße stabilisierte Thrombin enthält, neben dem Thrombin, drei Stabilisatoren:

Stabilisator I : HEPES-Puffer,

Stabilisator II : Thiomersal und

Stabilisator III: durch partielle Hydrolyse von Collagen erhaltene Gelatine.

Das stabilisierte Thrombin liegt vorteilhaft in Form einer isotonischen Salzlösung, insbesondere einer isotonischen Kochsalzlösung, vor.

Das erfindungsgemäß stabilisierte Thrombinzeitreagens enthält, sofern es in Lösung vorliegt, vorteilhaft als Pufferkomponente 0,03 bis 0,06 mol/l HEPES, vorzugsweise 0,05 mol/l, vom pH 7,55 (gemessen bei 20 °C). Dieser pH-Wert entspricht dem pKA, wodurch eine hohe Pufferkapazität erreicht wird (Tab. 3).

Selbst ein völlig von CO<sub>2</sub> entgastes Plasma (pH = 8,6) bleibt in seiner Thrombinzeit unbeeinflußt, da im Reagens-Plasma-Gemisch der pH-Wert unter 7,8 liegt.

Die Erfindungskonzeption beruht auf der überraschenden Feststellung, daß HEPES-Puffer als Thrombin-Stabilisator wirkt (Tab. 1) (Stabilisator I).

Das Thiomersal (Na-Salz der Ethylmercurithiosalicylsäure) (Stabilisator II) dient dazu, in der Thrombinlösung ein Wachstum von Mikroorganismen zu unterbinden.

Überraschenderweise wurde aber auch gefunden, daß Thiomersal in der angegebenen Konzentration einen thrombinstabilisierenden Effekt ergibt und mit dem HEPES-Puffer synergistisch wirkt (Tab. 1). Es wurde gefunden, daß 25 bis 40 ml Gelafusal (Serumwerk Bernburg) und vorzugsweise 33 ml je Liter Thrombinzeitreagens zu einer weiteren Thrombinstabilisierung führen (Stabilisator III), wobei Gelafusal 35 g durch partiellen Collagenabbau erhaltene Gelatine (mittlere Molekülmasse M = 35 kD) und 8,0 g Natriumchlorid pro Liter enthält.

Die vorzugsweise eingesetzten 33 ml Gelafusal entsprechen einer Konzentration von 1,16 g Gelatine/l Thrombinzeitreagens.

Zur Verwendung des Thrombinzeitreagens hat das erfindungsgemäß stabilisierte Thrombin vorteilhaft folgende Zusammensetzung pro 2500 NIH-Einheiten Thrombin in isotonischer Kochsalzlösung, vorzugsweise 0,154 mol/l, je Liter:

Stabilisator I : 26,4 bis 52,8 ml und vorzugsweise 44 ml HEPES-Pufferlösung einer Konzentration von 1,15 mol/l,

Stabilisator II : 250 bis 750 mg und vorzugsweise 500 mg Thiomersal und

Stabilisator III: 25 bis 40 ml und vorzugsweise 33 ml Gelafusal (erhalten durch partielle Hydrolyse von Collagen) mit einem Gehalt von 35 g partiell hydrolysierte Gelatine und 8,0 g NaCl pro Liter.

Das erfindungsgemäß stabilisierte Thrombin kann ferner auch als Stabilisator IV Polybren enthalten, vorzugsweise in einer Menge von 10 ml Polybrenlösung einer Konzentration von 1,1 mg/ml pro Liter.

Das stabilisierte Thrombin wird gemäß der Erfindung so hergestellt, daß zunächst das Thrombin, vorteilhaft handelsübliches, nicht besonders gereinigtes Thrombin, in isotonischer Salzlösung, vorteilhaft Kochsalzlösung, (0,154 mol NaCl/l) gelöst wird, worauf dann die Stabilisatoren I bis III und gegebenenfalls auch der Stabilisator IV zugegeben werden.

Das stabilisierte Thrombin kann vorteilhaft auch so hergestellt werden, daß die erforderliche Menge Thrombin in einer isotonischen Salzlösung, insbesondere Kochsalzlösung, die bereits die Stabilisatoren I bis III und im Falle eines heparinunempfindlichen Reagens auch den Stabilisator IV enthält, gelöst wird.

Dieses Gemisch kann zur längeren Lagerung lyophilisiert werden. Wiederaufgelöstes Lyophilisat zeichnet sich durch gleichbleibende, reproduzierbare Thrombinaktivität aus.

Lösungen des stabilisierten Thrombins, die direkt durch Mischen der Komponenten oder durch Auflösen eines Lyophilisats hergestellt sind, können ohne Aktivitätsverlust wiederholte Male, vorteilhaft durch Abkühlen auf -20 °C, eingefroren und, vorteilhaft durch Erwärmen auf +20 °C, wiederaufgetaut und verwendet werden.

Das erfindungsgemäß Verfahren zur Thrombinzeitbestimmung ist dadurch gekennzeichnet, daß stabilisiertes Thrombin gemäß der Erfindung eingesetzt wird. Das Thrombinzeitreagens wird günstigerweise mit Normalplasma auf die gewünschte Thrombinaktivität eingestellt, insbesondere so, daß Normalplasma innerhalb von 17 ± 0,2 s (Mittelwert aus 10 Bestimmungen) gerinnt.

Durch die spezielle Stabilisierung mit den Stabilisatoren I, II und III wird das Thrombin derart stabilisiert, daß es mehreren Gefrier-Auftau-Zyklen unterzogen und auch lyophilisiert werden kann, wobei die Lyophilisate eine hohe Lagerungsstabilität aufweisen. Mit dem stabilisierten Thrombin als Thrombinzeitreagens läßt sich die Thrombinzeit diagnostisch mit oder ohne Heparinabhängigkeit bestimmen, so daß es auch zur Überwachung der Heparintherapie im niedrigdosierten Bereich herangezogen werden kann.

Das erfindungsgemäß stabilisierte Thrombin kann also ohne Aktivitätsverlust in eingefrorenem wie auch in lyophilisiertem Zustand gelagert werden.

Das Thrombinzeitreagens zeichnet sich durch eine verbesserte Gebrauchsduer im gelösten, flüssigen

und im tiefgefrorenen Zustand bei Temperaturen zwischen vorzugsweise -20 °C und +20 °C, aber auch bei der Meßtemperatur von 37 °C aus, wobei mehrere Gefrier-Auftau-Zyklen mit dem gleichen Reagens möglich sind. Weiterhin werden mit der vorgeschlagenen Zusammensetzung des Thrombinzeitreagens die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Thrombinzeitbestimmung verbessert, und es wird die Möglichkeit

- 5 geschaffen, den bekannten Einfluß von Heparin auf das Ergebnis der Thrombinzeitbestimmung wahlweise auszuschalten oder das Ergebnis für die diagnostische Fragestellung der Beurteilung der Heparinwirkung im niedrigdosierten Bereich bei der Heparintherapie gezielt zu nutzen.

Das oben angegebene erfindungsgemäße Verfahren zur Stabilisierung von Thrombin als Thrombinzeitreagens beinhaltet vorzugsweise das Auflösen von etwa 2500 NIH-Einheiten Thrombin (beispielsweise

- 10 Thrombin für Testzwecke, Arzneimittelwerk Dresden GmbH) in einem Gemisch aus isotonischer Kochsalzlösung (0,154 mol/l NaCl), der die Stabilisatoren I (HEPES-Puffer, II (Thiomersal) und III (Gelafusal) im angegebenen Konzentrationsbereich unter Rühren zugegeben wurden, so daß das Gesamtvolumen 1,00 l beträgt. Dieses Gemisch wird im folgenden als Stabilisator I-III bezeichnet.

- 15 Die hergestellte Thrombinlösung wird in silikonisierten Glasgefäßen (z.B. Silikonisierung nach A.B.(D.L.)-DDR) aufbewahrt. Die stabilisierte Thrombinlösung wird nach A.B.(D.L.)-DDR mit einem Normalplasma als Substrat durch Zugabe von Thrombin, das mit NIH-E/ml im Stabilisator I-III gelöst ist, bzw. durch Zugabe von Stabilisator I-III allein so eingestellt, daß bei der Thrombinzeit (TZ) nach A.B.(D.L.)-DDR das Normalplasma innerhalb von 17,0 ± 0,2 s gerinnt.

- 20 Es wurde festgestellt, daß bei der Durchführung der Thrombinzeitbestimmung mit dem erfindungsgemäßen Thrombinzeitreagens die Methode heparinempfindlich ist; bei Verwendung von Thrombin für Testzwecke (Arzneimittelwerk Dresden GmbH) zeigt die TZ Verlängerungen bei ≥ 0,025 IE Heparin/ml (Tab. 4).

- 25 Setzt man dieser Thrombinlösung (Stabilisatoren I-III) Polybren (Hexadimethrinbromid, Poly(1,5-Dimethyl-1,5-diazoundecamethylenmethobromid), Copolymer aus N,N,N',N'-Tetramethyl-1,6-hexandiamin und 1,3-Dibrompropan, Heparin-Antagonist) (Stabilisator IV) in einer Konzentration von 0,11 g pro Liter Thrombinzeitreagens zu, so kommt es zu einer weiteren Stabilitätserhöhung des Thrombins (Tab. 1) (als Stabilisator I-IV bezeichnet).

- 30 Die Einstellung der Thrombinaktivität des Thrombinzeitreagens erfolgt wie beschrieben mit Normalplasma, wobei jedoch vorteilhaft Thrombin (100 NIH-E/ml) in dem Gemisch der Stabilisatoren I-IV gelöst und diese Stabilisatoren selbst zur Verdünnung des Thrombinzeitreagens eingesetzt werden.

Es wurde gefunden, daß Polybren in der angegebenen Konzentration von 0,11 g/l 2 bis 3 IU Heparin/ml inhibiert, so daß eine Thrombinzeitbestimmung unabhängig von Heparin möglich ist (Tab. 4).

- 35 Es wurde ferner festgestellt, daß die Empfindlichkeit der Thrombinzeit auf FDP, Dysfibrinogenämie bzw. Fibrinogenmangel unbeeinflußt bleibt. Demgemäß ist aus den Ergebnissen der Thrombinzeitbestimmung mit und ohne Polybren (Stabilisator I-IV, Stabilisator I-III) eine Einschätzung der Heparinwirkung bei einer Heparintherapie im niedrigen Dosierungsbereich möglich (Tab. 4).

- 40 Ein wesentlicher Vorteil des neuen Verfahrens ist die Tatsache, daß die Thrombin-RL\*-Reagenslösung nicht mehr für jede Untersuchungsserie neu in ihrer Aktivität eingestellt werden muß. Dadurch wird das Verfahren wesentlich anwendungsfreundlicher und präziser, Vorteile, die sich besonders im Bereitschaftsdienst und Nachtdienst zeigen. (Einzelfehler bei der Aktivitätseinstellung entfallen, vgl. Tab. 6).

- 45 Es wurde festgestellt, daß sowohl das Thrombinzeitreagens mit den Stabilisatoren I-III als auch das mit den Stabilisatoren I-IV ohne Aktivitätsverlust lyophilisiert werden kann (Tab. 2) und daß das Lyophilisat während der Lagerung stabil ist (Tab. 5). Ferner ergab sich, daß bei der Lyophilisation die Verwendung silikonisierter Glasgefäße zweckmäßig ist. Damit eröffnet die Erfindungskonzeption auch die Möglichkeit, Thrombinzeitreagentien industriell herzustellen und in standardisierter Form, d.h. auf die geforderte Thrombinaktivität eingestellt, in den Verkehr zu bringen.

Untersuchungen ergaben, daß die Thrombinzeitreagentien bis zu 10 Mal einem Gefrier-Auftau-Zyklus ausgesetzt werden können.

50 **Anwendungsbeispiel**

Herstellung des Thrombinzeitreagens und Einstellung auf die gewünschte Thrombinaktivität erfolgten wie bereits beschrieben.

55 **Thrombinzeitreagens mit den Stabilisatoren I-III**

Etwa 2500 NIH-Einheiten Thrombin (Thrombin für Testzwecke, Arzneimittelwerk Dresden GmbH) werden in einem Gemisch aus 923 ml isotonischer Kochsalzlösung (0,154 mol/l NaCl) gelöst, der die

folgenden Komponenten unter Röhren zugesetzt wurden:

- Stabilisator I : 44 ml HEPES-Puffer vom pH = pKA = 7,55 mit einer Konzentration von 1,15 mol/l;  
 Stabilisator II : 500 mg Thiomersal;  
 Stabilisator III: 33 ml Gelafusal.

5

### Thrombinzeitreagens mit den Stabilisatoren I-IV

Zu einem Liter des Gemisches mit den Stabilisatoren I-III setzt man als Stabilisator IV 10 ml einer Lösung von Polybren (1,1 g/l) zu und löst darin 2500 NIH-Einheiten Thrombin.

10 In den nachfolgenden Tabellen wird ein Überblick über die stabilisierenden Eigenschaften, die Puffereigenschaften und die Genauigkeitssteigerung der Stabilisatoren I-IV gegeben.

15

**Tabelle 1**

20

### Synergistische stabilisierende Wirkung von Stabilisator I-IV

25

#### Stabilität in Tagen (d)

Stabilisator	bei +4 °C	bei +20 °C
--------------	-----------	------------

#### Thrombin mit isotonischer Koch-

##### salzlösung

(ohne Stabilisator)	3	1
mit HEPES (I)	8	2
Thiomersal (II)	8	1
Gelafusal (III)	15	3
Polybren (IV)	15	15
HEPES + Thiomersal	15	3
HEPES + Gelafusal	15	3
HEPES + Polybren	15	3
Thiomersal + Polybren	15	15
Gelafusal + Polybren	15	15
HEPES + Thiomersal + Gelafusal (I-III)	150	15
HEPES + Thiomersal + Polybren	15	15
Thiomersal + Gelafusal + Polybren	15	15
HEPES + Gelafusal + Polybren	150	15
HEPES + Thiomersal + Gelafusal + Polybren	180	15
<b>zum Vergleich:</b>		
Rinderserumalbumin (1 %)	5	2

Tabelle 2

5                   **Stabilität der erfundungsgemäßen Stabilisatorkombinationen**  
 nach Einfrier-Auftau-Zyklen bzw. nach Lyophilisation

10                   Reagens	Anzahl der Einfrier-Auf- tau-Zyklen ohne Akti- vitätsverlust	TZ vor/nach Lyophilisation (s)
15                   Thrombin RL* nach A.B. (ohne Stabilisatoren)	0 (Aktivität sinkt nach 1 Zyklus auf rund 50 %)	17,0/60,2
20                   mit Stabilisator I-III	5	16,8/16,8
mit Stabilisator I-IV	10	17,0/17,1

Tabelle 3

30                   **pH-Wert-Abhängigkeit der Thrombinzeit nach A.B.(D.L.)-DDR**  
 und der mit HEPES stabilisierten Thrombinzeitvariante  
 gemäß der Erfindung

35                   pH-Wert des Plasmas	TZ nach A.B. (s)	TZ stabilisiert mit HEPES (s)
40                   7,40	26,8	23,8
7,80	28,2	24,0
8,00	28,4	23,9
45                   8,20	37,0	24,2
8,40	43,0	24,3
8,60	größer 180	24,5

Tabelle 4

5                   **Einfluß von Heparin auf die TZ (s) mit und ohne Polybren  
im Reagens**

10	Heparinkonzen- tration (E/ml)	0	0,025	0,05	0,075	0,1	0,5	1,0	2,0	3,0	5,0
15	Stabilisatoren I -III	18,0	20,2	32,5	64,8	194	>300	>300	>300	>300	>300
20	Stabilisatoren I -IV	17,8	17,9	18,0	17,8	18,0	17,9	18,2	18,1	18,3	27,8

Tabelle 5

25                   **Stabilität von lyophilisiertem Thrombinreagens**

30	Stabilisator	Anzahl der Einfrier- Auftau-Zyklen ohne Stabilitätseinbuße	Stabilität des Lyophili- sats bei +4 °C	Stabilität des ge- lösten Lyophilsats bei +4°C      +20°C      +37°C aufbewahrt zu je 2 ml
35	Stabilisator I -III	3	>8 Monate	7 d      3 d      2 h
40	Stabilisator I -IV	5	>8 Monate	7 d      4 d      2 h

45

50

55

Tabelle 6

5                   **Abhängigkeit der zeitabhängigen Genauigkeit von der  
Verfahrensweise bzw. vom Stabilisator der TZ-Bestimmung**

- 10                 1. Nach A.B. (D.L.)DDR (Thrombinaktivität ist für jede Serie  
mit Normalplasma erneut einzustellen.)
- 15                 2. Stabilisator I -III         25 d bei + 4 °C stabil
- 20                 3. Stabilisator J -IV         180 d bei + 4 °C stabil
- 25                 4. Lyophilisate mit Stabilisator  
I -III (täglich neu auflösen)
- 30                 5. Lyophilisate mit Stabilisator  
I -IV (täglich neu auflösen)

zeitabhängige Genauigkeit S (%)	Prüfmaterial = Kontrollplasma mit TZ = 19,0 s				
	1.	2.	3.	4.	5.
25	5,2	2,0	1,5	2,8	2,3

30                 Die obigen experimentellen Ergebnisse zeigen die überraschende, starke synergistische Wirkung der  
Stabilisatorkomponenten und die große Stabilität des erfindungsgem眉 stabilisierten Thrombins.

#### Patentansprüche

- 35                 1. Stabilisiertes Thrombin, insbesondere zur Verwendung als Thrombinzeitreagens, auf der Basis von  
Thrombin und eines Stabilisators,

40                 gekennzeichnet durch ein Stabilisatorgemisch aus

45                 Stabilisator I : HEPES-Puffer,

50                 Stabilisator II : Thiomersal,

55                 Stabilisator III: durch partielle Hydrolyse von Collagen erhaltene Gelatine.

- 60                 2. Stabilisiertes Thrombin nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch ein Stabilisatorgemisch, das ferner als  
Stabilisator IV Polybren enthält.

- 65                 3. Stabilisiertes Thrombin nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es in Form einer  
isotonischen Salzlösung, vorzugsweise einer isotonischen Kochsalzlösung (Konzentration 0,154 mol/l),  
vorliegt.

- 70                 4. Stabilisiertes Thrombin nach den Ansprüchen 1 bis 3, gekennzeichnet durch

- 0,03 bis 0,06 mol/l und vorzugsweise 0,05 mol/l Stabilisator I,
- 250 bis 750 mg/l und vorzugsweise 500 mg/l Stabilisator II

75                 und

- 25 bis 40 ml und vorzugsweise 33 ml Stabilisator III, der einen Gehalt von 35 g Gelatine und 8,0  
g NaCl pro Liter aufweist,

80                 sowie gegebenenfalls

- 0,11 g/l Polybren.

5. Stabilisiertes Thrombin nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es in isotonischer Kochsalzlösung pro Liter enthält:

- etwa 2500 NIH-Einheiten Thrombin, vorzugsweise handelsübliches, nicht besonders gereinigtes Thrombin,
  - 26,4 bis 52,8 ml und vorzugsweise 44 ml HEPES-Puffer vom pH = pKA = 7,55, einer Konzentration von 1,15 mol/l (Stabilisator I),
  - 250 bis 750 mg und vorzugsweise 500 mg Thiomersal (Stabilisator II)
- und
- 25 bis 40 und vorzugsweise 33 ml einer Gelatinelösung mit einem Gehalt von 35 g Gelatine und 8,0 g NaCl pro Liter
- sowie gegebenenfalls
- 0,11 g Polybrøn.

15 6. Stabilisiertes Thrombin nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es so eingestellt ist, daß Normalplasma innerhalb einer mittleren Zeit von  $17 \pm 0,2$  s gerinnt.

20 7. Stabilisiertes Thrombin nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es in trockener, lyophilisierter Form, vorzugsweise in Dosiereinheiten mit eingestellter Thrombinaktivität, oder in Form einer flüssigen oder eingefrorenen Lösung, vorzugsweise mit eingestellter Thrombinaktivität, vorliegt.

8. Verfahren zur Herstellung des stabilisierten Thrombins nach den Ansprüchen 1 bis 7,

25 gekennzeichnet durch

(A)

1. Herstellung einer vorzugsweise isotonischen Salzlösung, bevorzugt einer isotonischen Kochsalzlösung, der Stabilisatoren I, II und III und im Falle der Herstellung eines heparinunempfindlichen Reagens der Stabilisatoren I, II, III und IV mit den erforderlichen Konzentrationen

30 und

2. Lösung der erforderlichen Menge Thrombin, vorteilhaft von handelsüblichem, nicht besonders gereinigtem Thrombin, im Stabilisatorgemisch

35 sowie gegebenenfalls

3. Einfrieren der erhaltenen stabilisierten Thrombinlösung, vorteilhaft bei etwa -20 °C,

oder

(B)

1. Herstellung einer Salzlösung, bevorzugt einer Kochsalzlösung, von Thrombin

40 und

2. Zusatz der Stabilisatoren I, II und III und im Falle der Herstellung eines heparinunempfindlichen Reagens der Stabilisatoren I, II, III und IV in den jeweils erforderlichen Mengen, vorzugsweise unter Einstellung einer isotonischen Lösung,

45 sowie gegebenenfalls

3. Einfrieren der erhaltenen stabilisierten Thrombinlösung, vorteilhaft bei etwa -20 °C,

oder

(C)

50 1. Lyophilisierung einer gemäß den Verfahrensvarianten A oder B erhaltenen stabilisierten Thrombinlösung

und

2. Auflösen des Lyophilisats zur Verwendung in Wasser oder einer Salzlösung

55 sowie gegebenenfalls

3. Einfrieren der erhaltenen stabilisierten Thrombinlösung, vorteilhaft bei etwa -20 °C,

oder

5 (D)

1. Auftauen einer gemäß den Verfahrensvarianten A, B oder C erhaltenen und, vorteilhaft bei etwa -20 °C, eingefrorenen stabilisierten Thrombinlösung, vorzugsweise bei etwa 20 °C,

10 5 und gegebenenfalls

6 2. Wiedereinfrieren der stabilisierten Thrombinlösung, vorteilhaft bei etwa -20 °C,

7 sowie gegebenenfalls

8 3. Wiederauftauen der (wieder)eingefrorenen stabilisierten Thrombinlösung.

9 10 10. Verfahren zur Thrombinzeitbestimmung durch Gerinnung von Plasma, vorzugsweise von Normalplasma, mit stabilisiertem Thrombin, gekennzeichnet durch Verwendung des stabilisierten Thrombins nach den Ansprüchen 1 bis 7 bzw. eines nach einer der Verfahrensvarianten gemäß Anspruch 8 erhältlichen stabilisierten Thrombins als Thrombinzeitreagens.

11 15 10. Diagnoseset, gekennzeichnet durch ein stabilisiertes Thrombin nach Anspruch 7 und gegebenenfalls Wasser oder eine wässrige Lösung zum Lösen des Thrombins.

20

25

30

35

40

45

50

55



Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER  
RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90 11 8976

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)		
A	6218183 EMBASE 86213246; Z.S. LATALLO et al.: "Reaction of thrombins with human antithrombin III. I. Enzyme activity losses unrelated to the inhibitory reaction and their prevention", & TRHOMB. RES. (USA), 1986, 43/5 (507-521) * Zusammenfassung * - - -	1	C 12 N 9/74 C 12 N 9/96 C 12 Q 1/56		
A	EP-A-0 123 304 (ASAHI KASEI KOGYO K.K.) * Seite 5, Zeilen 9-24; Zusammenfassung * - - -	1			
D,A	DD-A-150 544 (GUENTER) * Anspruch 1 * - - -	1			
A	EP-A-0 244 771 (BOEHRINGER MANNHEIM GmbH) * Seite 7, Zeilen 8-24 * - - -				
A	DE-A-3 536 903 (BOEHRINGER MANNHEIM) * Seite 4, Zeile 3 * - - - -	1			
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)		
			C 12 N C 12 Q		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt					
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer			
Den Haag	05 März 91	VAN DER SCHAAL C.A.M			
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE					
X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet	E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelddatum veröffentlicht worden ist				
Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	D: in der Anmeldung angeführtes Dokument				
A: technologischer Hintergrund	L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument				
O: nichtschriftliche Offenbarung	.....				
P: Zwischenliteratur	&: Mitglied der gleichen Patentfamilie, Übereinstimmendes Dokument				
T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze					